



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1972602 B

(45) 授权公告日 2011.06.22

(21) 申请号 200580015976.5

A23L 3/3571 (2006.01)

(22) 申请日 2005.03.17

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

60/554,623 2004.03.18 US

US 4946870 A, 1990.08.07, 全文.

US 5744166 A, 1998.04.58, 全文.

幸治梅, 刘勤晋. 微生物防腐剂及其

在食品工业中的应用. 中国食品添加剂

2003-4. 2003, (2003-4), 86-89.

(85) PCT申请进入国家阶段日

2006.11.17

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2005/008855 2005.03.17

董炎明

阮永红

丘蔚碧

吴玉松

王勉

许聪义. 甲壳素 / 壳聚糖及其衍生物

在食品工业中的应用. 食品科技 2000 -

5. 2000, (2000 - 5), 28-31.

(87) PCT申请的公布数据

W02005/089416 EN 2005.09.29

(73) 专利权人 俄勒冈州, 由高等教育州委员会代

表俄勒冈州立大学

地址 美国俄勒冈

(72) 发明人 赵艳云 朴首一

马克·A·达埃舍尔

审查员 邓爱科

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限

责任公司 11219

代理人 杨青 樊卫民

(51) Int. Cl.

A23L 1/056 (2006.01)

A23L 1/0562 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 13 页 附图 4 页

(54) 发明名称

溶菌酶-脱乙酰壳多糖膜

(57) 摘要

本发明公开的一个方面涉及包括掺入脱乙酰壳多糖聚合物基质内的溶菌酶的复合膜。另一个方面中, 本发明公开了包括脱乙酰壳多糖, 以及基于脱乙酰壳多糖重量计约 10 至约 200 重量百分比的溶菌酶的膜。还公开了制备膜的方法, 所述方法包括将脱乙酰壳多糖和溶菌酶溶解或分散于水相介质中产生成膜溶液或分散体; 将成膜溶液或分散体施加至基质表面; 以及将所述成膜溶液或分散体转化为膜。在尤其有用的应用中, 所述膜为用于食品的抗微生物保护剂。

1. 膜, 包含:
 - (a) 脱乙酰壳多糖 ; 和
 - (b) 基于所述脱乙酰壳多糖的重量计 10 至 200 重量百分比的溶菌酶。
2. 权利要求 1 的膜, 包含 10 至 100 重量百分比的溶菌酶。
3. 权利要求 1 的膜, 进一步包含至少一种选自增塑剂或交联剂的其它组分。
4. 权利要求 3 的膜, 其中所述增塑剂以基于脱乙酰壳多糖重量计 1 至 50 重量百分比的量存在。
5. 用于制备权利要求 1 的膜的方法, 包括:

将脱乙酰壳多糖和溶菌酶溶解或分散于水相介质中产生成膜溶液或分散体 ;
将成膜溶液或分散体施加至基质表面 ; 以及
将所述成膜溶液或分散体转化为膜。
6. 权利要求 5 的方法, 其中所述脱乙酰壳多糖溶于水相有机酸中。
7. 权利要求 6 的方法, 其中所述水相有机酸选自乙酸、山梨酸、丙酸、乳酸、谷氨酸、苯甲酸、柠檬酸、马来酸、甘醇酸、丙烯酸、琥珀酸、草酸、抗坏血酸、酒石酸或其混合物。
8. 权利要求 6 的方法, 其中所述溶菌酶溶于水中产生溶菌酶溶液, 然后将所述溶菌酶溶液与所述脱乙酰壳多糖溶液混合。
9. 权利要求 8 的方法, 其中在环境室内条件下发生所述溶菌酶溶液和所述脱乙酰壳多糖溶液的混合。
10. 权利要求 8 的方法, 其中所述溶菌酶溶液包括 5 至 20 重量百分比的溶菌酶。
11. 权利要求 5 的方法, 其中经干燥所述成膜溶液或分散体转化为膜。
12. 权利要求 5 的方法, 其中所述基质表面包括食品表面。
13. 权利要求 12 的方法, 其中所述膜包括抗微生物有效量的溶菌酶, 并且所述膜的所述抗 - 微生物活性持续至少三周。
14. 权利要求 5 的方法, 进一步包括将至少一种其它的添加剂溶解或分散在水介质中。
15. 权利要求 5 的方法, 进一步包括将膜置于食品表面上。
16. 权利要求 12 的方法, 其中成膜溶液或分散体通过喷涂、刷涂、滴涂或浸涂施加于食品表面。
17. 通过权利要求 5 的方法产生的膜。
18. 权利要求 17 的膜, 其中所述溶菌酶以抗微生物有效量存在于膜中。
19. 在食品至少一部分表面上包括权利要求 1 的膜的食品, 其中所述抗微生物膜包含掺入聚合物基质内的溶菌酶。
20. 权利要求 19 的食品, 其中所述溶菌酶以基于脱乙酰壳多糖重量计 10 至 200 重量百分比的量存在于膜中。
21. 权利要求 19 的食品, 其中膜具有 1 至 300 g mm/m²d kPa 的水蒸气渗透率。
22. 权利要求 19 的食品, 其中膜通过以下方法制备, 包括:

将脱乙酰壳多糖和溶菌酶溶解或分散于水介质中产生成膜溶液或分散体 ;
将所述成膜溶液或分散体施加至基质表面 ; 以及
将所述成膜溶液或分散体转化为膜。

溶菌酶 - 脱乙酰壳多糖膜

[0001] 有关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2004 年 3 月 18 日提交的美国临时专利申请 No. 60/554, 623 的优先权，其在此处引入作为参考。

技术领域

[0003] 本发明公开了特定用于保护食品的抗微生物膜。

背景技术

[0004] 在固体或半固体食品中，微生物生长主要发生在表面上。加热处理和化学防腐剂是用于维持微生物学安全和食物质量的最广泛使用的方法。微生物抗性增强的包裹膜通过抗微生物物质从承载膜结构至食物表面的缓释而具有用于确保食物表面微生物学安全性的巨大潜力。此外，消费者对于合成化学食品防腐剂的担忧已引起对替代的更“有利于消费者”的可食用保护膜更广泛的兴趣。

[0005] 溶菌酶为在许多天然系统中发现的经过充分研究的水解酶。其为具有充分研究的空间结构和序列的小并且稳定的酶。溶菌酶由于其在宽范围的 pH 和温度条件下的稳定性而具有用于食品保藏中的潜力。然而，其对革兰氏阴性细菌有限的抗菌效力限制了其在食品工业中的应用。脱乙酰壳多糖为已知的成膜生物聚合物，其也表现出抗微生物活性。

[0006] 如今，对具有增强的微生物抗性并且机械性能没有显著削弱的膜具有持续的需求。

发明内容

[0007] 本发明公开的一个方面涉及包括整合在脱乙酰壳多糖聚合物基质内的溶菌酶的复合膜。另一个方面中，本发明公开了包括脱乙酰壳多糖，以及基于脱乙酰壳多糖重量的约 10 至约 200 重量百分比的溶菌酶的膜。

[0008] 本发明还公开了用于制备膜的方法，包括将脱乙酰壳多糖和溶菌酶溶解或分散于水介质中而生成膜溶液或分散体；向基质表面施加该成膜溶液或分散体；并且将成膜溶液或分散体转化为膜。

[0009] 在尤其有效的应用中，该膜为用于食品的抗微生物保护剂。

附图说明

[0010] 图 1 图示了作为时间的函数的溶菌酶从溶菌酶脱乙酰壳多糖复合膜基质向 0.15M 磷酸盐缓冲液的释放模式图。N = 6；L0 = 0% 溶菌酶 (w/w 脱乙酰壳多糖)；L20 = 20% 溶菌酶 (w/w 脱乙酰壳多糖)；L60 = 60% 溶菌酶 (w/w 脱乙酰壳多糖)；L100 = 100% 溶菌酶 (w/w 脱乙酰壳多糖)。膜厚度为 $72.6 \pm 8.2 \mu\text{m}$ 。

[0011] 图 2A 和 2B 图示了溶菌酶 - 脱乙酰壳多糖复合膜对 BHI 肉汤培养基中 E. coli (2A) 和 MRS 肉汤培养基中粪链球菌 (2B) 的作用效果的图。N = 6；对照 = 无膜；L0 = 0% 溶菌酶

(w/w 脱乙酰壳多糖) ;L20 = 20%溶菌酶 (w/w 脱乙酰壳多糖) ;L60 = 60%溶菌酶 (w/w 脱乙酰壳多糖) ;L100 = 100%溶菌酶 (w/w 脱乙酰壳多糖)。

[0012] 图 3A-3D 为在 1,000X 放大倍数时溶菌酶脱乙酰壳多糖复合膜表面的扫描电子显微镜照片 ;L0 (3A)、L20 (3B)、L60 (3C)、L100 (3D)。L0 = 0%溶菌酶 (w/w 脱乙酰壳多糖) ;L20 = 20%溶菌酶 (w/w 脱乙酰壳多糖) ;L60 = 60%溶菌酶 (w/w 脱乙酰壳多糖) ;L100 = 100%溶菌酶 (w/w 脱乙酰壳多糖)。

[0013] 图 4A-4D 为在 1,000X 放大倍数时溶菌酶 - 脱乙酰壳多糖复合膜横截面的扫描电子显微镜照片 ;L0 (4A)、L20 (4B)、L60 (4C)、L100 (4D)。L0 = 0%溶菌酶 (w/w 脱乙酰壳多糖) ;L20 = 20%溶菌酶 (w/w 脱乙酰壳多糖) ;L60 = 60%溶菌酶 (w/w 脱乙酰壳多糖) ;L100 = 100%溶菌酶 (w/w 脱乙酰壳多糖)。

[0014] 发明详述

[0015] 为了便于理解,以下更详细描述了此处所用的下列术语:

[0016] “环境室内条件”指约 10℃至约 40℃,通常约 20℃至约 25℃的室温,大约 1 个大气压的压力,以及包含一定量湿气的气氛。

[0017] “类似物”为化学结构不同于亲本化合物的分子,例如同系物(因化学结构的增加而不同,如烷基链长度的不同)、分子片段,一个或多个官能团不同,或电离改变的结构。

[0018] “抗微生物有效量”为相比缺乏抗微生物组分的对照样品,足以抑制样品中至少一种微生物的生长达到统计上显著的程度,优选至少约 25%,更优选至少约 50%,且最优选完全抑制该微生物的生长的抗微生物组分或组分混合物的量。

[0019] 如下文更详细描述“脱乙酰壳多糖”(还称为聚-(1→4)-β-D-葡萄糖胺)包括去乙酰化的壳多糖(壳多糖也称为 β-(1→4)-聚-N-乙酰基-D-葡萄糖胺)及其盐。甲壳类水生生物和甲壳纲动物的壳为脱乙酰壳多糖所来源的壳多糖的常见来源。

[0020] “膜”包括涂层,并且该膜在其施用的食品表面或在其形成的食品表面可以是间断的或基本上连续的。例如,“膜”包括可覆盖于食品上的独立膜以及通过喷涂、浸涂、点涂或类似的技术在食品上形成的涂层。

[0021] “抑制”指此处公开的膜减缓或终止某些微生物在某时段的生长或增殖。

[0022] “溶菌酶”表示催化某些细菌细胞壁粘多糖水解,具体地为 N-乙酰胞壁酸和 N-乙酰葡萄糖胺之间的 β(1-4)糖苷键,并引起细菌溶解的酶家族。可用于此处的溶菌酶包括天然-存在的溶菌酶、合成的溶菌酶以及下文更详细描述的重组溶菌酶。

[0023] “微生物”或“微生物的”用于指显微镜可见的生物体或物质,包括能感染人或动物和/或引起食物腐败或其他不合需要的食物降解或改变的真菌和细菌生物体。因此,术语“抗-微生物的”此处用于指杀死或抑制真菌和/或细菌生物体生长的材料或试剂。

[0024] 以上术语描述仅用以帮助读者而提供,而不应该视为具有小于本领域普通技术人员所理解的范围或限制所附权利要求的范围。

[0025] 除非上下文另有明确表明,单数术语“一”、“一个”和“这个”包括复数对象。类似地,除非上下文另有明确表明,单词“或者”包括“和”。单词“包含”指“包括”。除非另有陈述,化学命名法中组分的描述指在添加至说明书中任何指定组合时的组分,但不一定预先排除一旦混合后混合物组分中的化学相互作用。

[0026] 此处公开的膜包括至少一种脱乙酰壳多糖和至少一种溶菌酶,其中两者都为可大

量获得的可更新材料。已发现基于脱乙酰壳多糖的膜基质可有效携带产生溶菌酶-脱乙酰壳多糖复合膜的高浓度的溶菌酶。溶菌酶可以缓释的方式从聚合脱乙酰壳多糖膜基质释放并且保留其对细菌细胞壁基质的溶解活性。例如,抗微生物组分溶菌酶(以及某些情况中的脱乙酰壳多糖)可从膜释放并且迁移入食品结构中。与单独的脱乙酰壳多糖或单独的溶菌酶相比,这种复合膜具有对革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌的增强、协同的抗微生物活性,而不削弱该膜的防潮层特性。在膜的某些例子中,所有组分为对人或动物消耗而言都是可安全食用的并且可从可更新的来源得到。此外,膜为可生物降解的。

[0027] 溶菌酶基本上均匀分布于脱乙酰壳多糖分子形成的聚合网状结构中。溶菌酶可以分布于脱乙酰壳多糖网状结构内的微颗粒形式存在,其中溶菌酶分子与脱乙酰壳多糖分子氢键键合和/或通过范德华力互相作用。

[0028] 脱乙酰壳多糖为来源丰富、可更新的并且无毒的聚合物,与许多其他物质可以生物相容。可采用任何形式或等级(例如食物或医用)的脱乙酰壳多糖制备膜。例如,脱乙酰壳多糖的粘度平均分子量可在约 20 至约 2,000kD 的范围,并且脱乙酰作用的程度在约 70 至约 90% 的范围。根据一种用于产生膜的示例性方法,脱乙酰壳多糖组分(或不同脱乙酰壳多糖的混合物)最初溶于引起脱乙酰壳多糖盐形成的酸水溶液中。产生存在于膜中的脱乙酰壳多糖盐的例子包括脱乙酰壳多糖乙酸盐、脱乙酰壳多糖山梨酸盐、脱乙酰壳多糖丙酸盐、脱乙酰壳多糖乳酸盐、脱乙酰壳多糖谷氨酸盐、脱乙酰壳多糖苯甲酸盐、脱乙酰壳多糖柠檬酸盐、脱乙酰壳多糖马来酸盐、脱乙酰壳多糖甘醇酸盐、脱乙酰壳多糖丙烯酸盐、脱乙酰壳多糖琥珀酸盐、脱乙酰壳多糖草酸盐、脱乙酰壳多糖抗坏血酸盐、脱乙酰壳多糖酒石酸盐和其混合物。膜中脱乙酰壳多糖的量可根据所需的膜性质而改变。例如,基于膜的总固体重量,膜可包含约 25 至约 90,更尤其约 35 至约 65 重量百分比的脱乙酰壳多糖。

[0029] 溶菌酶为存在于各种生物体,包括病毒、禽类、哺乳动物和植物中的天然抗微生物多肽。人体内,溶菌酶可见于脾脏、肺、肾、白血球、血浆、唾液、乳汁、眼泪和软骨中。因此,溶菌酶可从人的乳汁、泪液、唾液和鼻涕中分离。在牛的乳汁和初乳中也得以发现。还可能从花椰菜汁分离溶菌酶。然而,允许溶菌酶以工业规模提取的最重要的来源为鸡的清蛋白。溶菌酶亦称为胞壁酸酶或 N-乙酰基胞壁酰水解酶。人形式还可以重组产生。在此处公开的膜中,溶菌酶的有效量可根据溶菌酶的来源而改变。一些溶菌酶比其它的更有效,鸡的溶菌酶比人的溶菌酶活性要低。膜中溶菌酶的抗微生物有效量还可根据所需的膜性质而改变。尤其是,溶菌酶的最低量应足以提供抗微生物活性。溶菌酶的最大量不应大至明显降低膜的机械或水蒸气渗透率性质。例如,以脱乙酰壳多糖的重量计,溶菌酶可以约 10 至约 200 重量百分比的量,更尤其约 10 至约 100 重量百分比,并且最尤其约 30 至约 90 重量百分比存在于膜中。换言之,膜可包括上至两倍脱乙酰壳多糖量的溶菌酶的量。如果溶菌酶的量超过以脱乙酰壳多糖的重量计的百分之 200,膜可能变得非常易碎并且机械强度较弱。

[0030] 膜的任选组分为至少一种增塑剂,其可以是或不是可更新的材料。增塑剂降低膜的脆性,并且提高膜的挠性和冲击抗性。示例性的增塑剂包括甘油、山梨糖醇、丙二醇、乙二醇、二甘醇、三甘醇、聚乙二醇(例如,PEG300 和 PEG400)、酒石酸二丁酯、丙二醇、丁二醇、乙酰单酸甘油乙酯和其混合物。膜中增塑剂的量可根据所需的膜性质而改变。尤其是,由于溶菌酶较弱的成膜性质,增塑剂的量应随着溶菌酶浓度的增加而提高。例如,以脱乙酰壳多糖的重量计,膜可包含约 1 至约 50,更尤其约 20 至约 30 重量百分比的增塑剂。

[0031] 膜的另一种任选组分为至少一种交联剂,其可以是或不是可更新的材料。交联剂可改进膜的防水汽特性并降低膜的水溶性。示例性的交联剂包括戊二醛、甲醛、乙二醛、双醛淀粉、包含多价离子(例如钙和镁阳离子)的物质和其混合物。膜中交联剂的量可根据所需的膜性质而改变。例如,基于脱乙酰壳多糖的重量,膜可包含约 1 至约 20,更尤其约 5 至约 10 重量百分比的交联剂。

[0032] 此外任选的组分包括抗氧化剂、另外的抗菌剂、调味剂/着色剂、疏水剂、营养药品和类似的添加剂。为了改进防水性质,疏水添加剂,如脂肪酸(即油酸、月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸和硬脂酸)、乙酰化甘油酯、蜡(即巴西棕榈蜡、蜂蜡和石蜡)以及油剂(即,矿物油和植物油)可以脱乙酰壳多糖重量计的约 20 至约 100% 的浓度范围整合到膜组合物中。营养剂,如矿物质和维生素可整合到膜基质中以增强包装或涂层产品的营养价值。例如,可掺入钙、锌和维生素 E 以增强包装或涂层产品的健康益处(参见 Park, S.-I. 和 Zhao, Y. 2004. Incorporation of High Concentration of Mineral or Vitamin into Chitosan-Based Films. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2004, vol. 52, pp. 1933-1939)。

[0033] 膜可通过任何成膜技术包括浇铸(即独立成膜)、浸涂、喷涂、刷涂、降-膜和类似的方法制备。根据一种变化,膜的所有组分混合于液体混合物中(即,膜-形成混合物),其随后形成膜。例如,液体混合物可基本上均匀分布于基质表面并且随后干燥而形成膜。在具体的例子中,膜的组分为水溶性的或可分散的或经修饰而变成水溶性的或可分散的(即溶解的)。组分一起混合于水溶液中(即,水为载体溶剂或介质),其随后在环境室温和湿度下风干而形成膜。或者,膜组分在有机溶剂载体中为可溶的。膜组分可以任何顺序一起混合。

[0034] 膜-形成混合物应该相对便于制造和使用。膜-形成混合物的粘度应该足够低以允许混合物施加和涂布于基质上而无需任何高-强度涂布技术或设备。例如,膜-形成混合物的粘度可在约 10cps 至约 200cps 的范围。

[0035] 脱乙酰壳多糖在水相有机或无机酸中为可溶的。合适的水相有机酸包括乙酸、山梨酸、丙酸、乳酸、谷氨酸、苯甲酸、柠檬酸、马来酸、羟基乙酸、丙烯酸、琥珀酸、草酸、抗坏血酸、酒石酸和其混合物。通常,有机酸为非常淡的例如,根据特定类型酸,约 0.5 至约 5,更尤其约 1 至约 2 的重量百分比的浓度。

[0036] 通常,脱乙酰壳多糖预先确定的量在环境室温下溶解于水相有机酸中以产生脱乙酰壳多糖盐溶液。混合物的 pH 可以为约 2.5 至约 6.3,更尤其约 5.0 至约 6.0。溶于酸水溶液中的脱乙酰壳多糖量,根据水的重量以及取决于膜终产品中所需的脱乙酰壳多糖量,可以为约 1 至约 5,更尤其约 2 的重量百分比。脱乙酰壳多糖盐溶液还可包括任何以上-所述的任选组分如增塑剂。

[0037] 溶菌酶随后可添加至脱乙酰壳多糖盐溶液中。溶菌酶可以纯净、工业级、食物级或药物级的溶液形式添加,其可从不同商品供应商处获得。或者,溶菌酶原液可通过将预定量的溶菌酶溶解于蒸馏水中而制备。溶于水中的溶菌酶的量,根据水的重量以及取决于膜终产品中所需的溶菌酶浓度,可以为约 1 至约 20,更尤其约 10 至约 15 的重量百分比。如果溶菌酶的量太大,膜-形成溶液可能变得不能接受的淡,将不利地影响膜的性质。溶菌酶原液还可包括任何以上-所述的任选组分如增塑剂。

[0038] 脱乙酰壳多糖盐溶液和溶菌酶原液在环境室内条件下一起混合而产生成膜溶液。或者,成膜溶液可在约 50℃ 的温度加热或加热至约 50℃ 的温度以增强溶解。相对于溶菌酶原液的量,选择脱乙酰壳多糖盐溶液的量以提供所需浓度的溶菌酶。产生的水相成膜溶液的 pH 可调节至在约 5 至约 6 的范围内以通过提供低酸性环境而保护食物。

[0039] 膜可通过任何方法用于食物。膜通过将成膜溶液涂至基质而从成膜溶液形成。例如,成膜溶液可喷涂或刷涂在表面上以形成防护涂层,或食品可浸入该成膜溶液中。或者,浇铸膜可通过包装或类似的方法而用于食品表面。涂布溶液的基质可在约 25℃ 至约 65℃ 的温度加热约 2 小时至约 48 小时以形成膜。在涉及直接涂布食品的改变中,干燥时间通常较短(例如,带有加压气流约 5 至约 60 分钟)。

[0040] 膜抗微生物活性的持续时间取决于环境条件。在高水分环境中,涂层组分进入食品的迁移率将提高,因此降低抗微生物活性的有效持续时间。某些例子中,在环境室内条件中,膜可保持完好(即,膜保持其颜色、大小和机械强度)高达约四个月。另外的例子中,抗微生物活性可保持高达约三周。

[0041] 施加于食品表面的涂层量应足以在表面上形成基本上连续的膜。所述量随各种因素的变化而变化,包括食品类型、施加方法和所需性质,但其可在约 2 至约 30,更尤其约 5 至约 10mg/cm² 基质表面积的范围。根据某些例子,独立膜应具有至少约 20 μm,更尤其约 30 至约 80 μm 的厚度。小于 20 μm 的厚度对于直接在食物表面上形成的涂层(例如通过浸涂)为示例性的。

[0042] 此处公开的膜设计为尤其针对抑制食物表面上的致病和腐败细菌以及真菌。示例性的细菌包括胚芽乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)、单核细胞增多性李氏杆菌 (*Listeria monocytogenes*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、肉毒杆菌 (*Clostridium botulinum*)、沙门氏菌 (*Salmonella* spp) 和假单胞菌 (*Pseudomonas* spp)。示例性的真菌包括黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、*Monoilinia fructicola*、灰葡萄孢菌 (*Botrytis cinerea*) 和根霉 (*Rhizopus* spp)。

[0043] 如此处所述保护的食品通常为易受由微生物生长、脱水(失水)和/或因呼吸作用的成熟所引起的质量变质影响的食品。通常,乳酪(切片的或块的)和加工的肉制品(火腿、热狗、香肠等等)可利用开发的膜包装或用成膜溶液涂层。易坏的水果和蔬菜商品,如浆果、樱桃、葡萄、苹果、梨、油桃、李子和杏可被涂层而增强微生物安全性并延长产品的贮存期限。

[0044] 膜呈现所希望的透水汽特性。例如,膜的水蒸气渗透率可在约 1 至约 300,更尤其约 10 至约 100gmm/m²dkPa 的范围。膜的水蒸气渗透率和机械性质取决于成膜期间的相对湿度(RH),因为水可用作脱乙酰壳多糖膜中的增塑剂。在低 RH 环境中(例如,低于 40%),膜为具有改进的防水特性的相对较好的防气材料。50% RH 中,膜可以显示出比得上商业-可得的低密度聚乙烯(LDPE)膜的中等机械性质(例如,10 至 100MPa 的张力强度以及 10 至 50% 的断裂伸长率)。膜的防水性质可通过添加脂类材料而得以改进。

[0045] 实施例

[0046] 如下所述具体的实施例为用于说明性目的的并且不应认为限制附加权利要求的范围。

[0047] 实施例 1

[0048] 材料

[0049] 使用来自 Vanson Inc. (Redmond, WA) 的虾脱乙酰壳多糖而无需进一步纯化。虾脱乙酰壳多糖通过 25℃ 时 1% w/w 乙酸水溶液的 11cps 粘度以及 89.9% 的脱乙酰作用得以表征。蛋清溶菌酶获自 Eiprodukte GmbH und Co. (Germany)。USP (United States Pharmacopeia) 级甘油获自 EM Science (Darmstadt, Germany)。试剂级冰醋酸获自 J. T. Baker (Phillipsburg, NJ)。

[0050] 革兰氏阳性粪链球菌 (*Streptococcus faecalis*) ATCC 14508 和革兰氏阴性大肠杆菌 B 型用作检验生物体。获自 Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO) 的冻干溶壁微球菌 (*Micrococcus lysodeikticus*) 用于溶菌酶释放模式的测量。脑心浸液培养液 (brain heart infusion) (BHI)、MRS 肉汤培养基和琼脂购自 Difco Becton, Dickinson and Company (Sparks, MD)。

[0051] 成膜溶液的制备

[0052] 通过将脱乙酰壳多糖溶液与溶菌酶溶液混合而制备成膜溶液 (FFS)。通过将 2wt% 脱乙酰壳多糖溶解于添加 25% 甘油 (w/w 脱乙酰壳多糖) 的 1wt% 乙酸溶液中而制备脱乙酰壳多糖溶液。通过将 10wt% 溶菌酶溶解于添加 25% 甘油 (w/w 溶菌酶) 的蒸馏水中而制备溶菌酶溶液。然后将溶菌酶溶液以 0、20、60 或 100% 的浓度 (每脱乙酰壳多糖的溶菌酶干重百分比) 混合入脱乙酰壳多糖溶液中。将得到的混合物于 Model PT10-35 (Kinematica AG, Switzerland) 中以 3,000rpm 匀化 60 秒。用 5N 的氢氧化钠将 FFS 的 pH 调节至 5.2。所有样品溶液过滤通过尼龙网以除去不溶残渣并在真空下脱气 (Model 10211-P204, GastMfg. Corp., Benton Harbor, MI)。

[0053] 成膜

[0054] 将计算量的每份脱气的 FFS 以 260×260mm 的面积浇铸于水平的 Teflon-涂布的玻璃板上以获得约 70 μm 的均匀膜厚度。室内环境下 (24±2℃ 和 40±5% 的相对湿度) 干燥 2 天后, 从板上剥离干燥的膜并且切成片用于分析。尺寸 25×25mm 的膜片段用于密度和水分含量的评估。尺寸 25×86mm 的膜片段用于机械测试。尺寸 70×70mm 的膜片段用于水蒸气渗透率的测试。所有测量之前, 膜片在设置为 25℃ 和 50% 相对湿度的环境室 (Model T10RS, Tenney Environmental, Williamsport, PA) 中调节至少 2 天。

[0055] 膜厚度 / 密度和含水量的测量

[0056] 在 25℃ 和 50% 调节 2 天后, 利用卡尺测微计 Model No. 293-766-30 (Mytutoyo Manufacturing Co. Ltd., Japan) 在每个膜样本的五个随机位置测量膜厚度。膜密度通过将膜重量除以膜体积进行计算。膜的含水量通过在鼓风干燥箱 (Precision Scientific Inc., Chicago, IL) 中 105℃ 干燥膜样本 18 小时的重量分析进行。含水量的百分比计算为湿重 (wet base)。

[0057] 溶菌酶释放的测定

[0058] 约 0.03g 的溶菌酶-脱乙酰壳多糖膜样本的样品浸入小瓶中 20ml 的 0.15M 磷酸盐缓冲液 (pH6.2) 中, 并利用振荡器 (New Brunswick Scientific Co. Inc., New Brunswick, NJ) 室温下在 5rpm 振荡。冻干溶壁微球菌的底物储液制备于 0.15M 磷酸盐缓冲液中 (450nm 处 0.065 的吸光度)。以 0、0.25、1、4、12、24 和 48 小时的时间间隔取 1 μl 的混合物样品。这些样品与 2.5ml 溶壁微球菌底物在比色杯中混合并且随后立即在 25℃ 用 Shimadzu UV-Vis

2100 分光光度计 (ShimadzuCo., Japan) 读数 40 秒。溶菌酶的比活 (activity rate) 通过测量 450nm 处溶液吸光度的降低而确定, 其反映了细胞壁底物的水解。光密度的降低表示为每分钟 Mille- 吸光度单位的变化 (Mabs/min)。活性单位根据 0.15M 磷酸盐缓冲液中标准化溶菌酶浓度的回归线转换成 mg/l 溶菌酶, 并且随后转换成每克干膜释放的溶菌酶克数。

[0059] 抗微生物活性

[0060] 大肠杆菌和粪链球菌分别在脑心浸液培养液 (BHI) 和 MRS 肉汤培养液中 37℃ 过夜培养。1ml 的这些微生物样品用 99ml 相同的培养液稀释以获得大约 10^7 CFU/ml 的接种物。约 0.03g 的每个膜样本置于培养皿 (petridish) (85mm 直径) 中, 随后向其中倒入 10ml 接种物。未暴露于膜的接种物用作对照。

[0061] 培养皿在室温下 50RPM 振荡。在 0、6、12 和 24 小时时取样, 用稀释小瓶 (Dilu-LockII™ Butterfield's 缓冲液, Hardy Diagnostics, Santa Maria, CA) 稀释, 并且一式两份接种平皿。对于接种平皿而言, BHI 和 MRS 琼脂分别用于大肠杆菌和粪链球菌。每个平皿在菌落计数前在 37℃ 温育 48 小时。

[0062] 水蒸气渗透率的测量

[0063] 利用 25℃ 和 100/50% RH 梯度的杯碟法 (cup method) 按照 ASTM 96 (ASTM 2000a) 确定水蒸气渗透率 (WVP)。11ml 蒸馏水置于有机玻璃 (Plexiglas®) 制成的 57mm 内径以及 15mm 内部深度的每个检验杯中。水和膜间的距离为 10.7mm 并且有效膜面积为 25.5cm^2 。检验杯组件置于控温并控湿的室中 (25℃ 以及 50% RH)。每个杯组件利用电子天平 (0.0001g 精度) 在 6 小时中每小时进行称重记录随时间水分的损失。随后利用 WVP 校正法 (Gennadios 及其它人 1994) 校正 WVP 在膜和水表面之间滞流的空气间隙的阻力。

[0064] 机械性能

[0065] 膜的机械性能利用纹理分析器 (TA.XT2i, Texture Technologies Corp., Scarsdale, NY) 测定。所有性能测量在从室取出膜样本后立即进行, 从而把水分差异减到最低。ASTM D882 法 (ASTM 2000b) 用于测量断裂时的张力强度 (TS) 和伸长率 (EL)。每个膜样本安放在纹理分析器的柄间 (TA96) 并且用 50mm 的初始柄间距和 1mm/s 的十字头速度进行检验。TS 值以测量的最大负载 (N) 除以膜横截面积 (mm^2) 得到的 MPa 单位报告。EL 值通过记录的断裂伸长率除以样本的初始长度并且乘以 100 而获得。

[0066] 微观结构

[0067] 膜的表面和内部结构利用扫描电子显微镜术 (AmRay 3300FE 场发射 SEM, AmRay, Bedford, MA) 进行评估。膜片安放于铝短棒上并利用溅射涂料器 (Edwards model S150B Sputter Coater; BOC Edwards Vacuum, Ltd, UK) 涂布金-钼合金。每个涂布的样品利用直接垂直于样品的电子束的 5kV 电压检验。

[0068] 统计分析

[0069] 所有实验重复三次。每次重复中, 两个膜样本用于溶菌酶释放和抗微生物活性测量; 五个膜样品用于密度、含水量和 WVP 测量; 10 个膜样品用于机械性能测量。利用 SAS (Statistical Analysis System Institute Inc., Cary, NC), 一般线性模型 (GLM) 方法用于检验不同膜间的差异。对所有的处理进行用于方差分析 (ANOVA) 的 PROC GLM。进行 PROC REG 以找到用于所测量应答的合适的回归模式。Duncan's 多-范围检验用于多种方法的

比较。差异显著性确定为 $p < 0.05$ 。

[0070] 结果 – 成膜和基本的物理性能

[0071] 当将溶菌酶掺入脱乙酰壳多糖溶液中时,任何 FFS 中均未观察到沉淀。此表明乙酸 – 溶解的脱乙酰壳多糖溶液具有与水溶性溶菌酶良好的相容性。所有干膜很容易从浇铸板剥离。所有类型的膜的厚度通过浇铸计算量的 FFS 而小心控制在 $72 \pm 11 \mu\text{m}$ 的范围内。此确保膜厚度中观察到无统计学差异 ($p < 0.05$)。

[0072] 下表 1 显示每个经检验的膜的密度和含水量 ($n = 15$)。纯脱乙酰壳多糖膜 (L0) 具有密度和含水量的最高值。所有膜当中密度无统计学水平的差异。随着溶菌酶浓度的提高含水量趋于降低。虽然不受任何理论的束缚,此可能是因脱乙酰壳多糖和溶菌酶包含大量 $-OH$ 和 $-NH_2$ 基团而发生。这些基团中氢键键合是主要的引力。溶菌酶分子添加入脱乙酰壳多糖链可通过提高脱乙酰壳多糖和溶菌酶分子间的相互作用,如氢键键合和范德华力相互作用而改变脱乙酰壳多糖分子的结构构型。溶菌酶含有亲水和疏水的氨基酸。成膜期间,随着亲水氨基酸侧链通过在折叠溶菌酶中起重要作用的相同的疏水相互作用而向水相 FFS 伸出而形成溶菌酶疏水核 (Proctor and Cunningham 1988)。膜基质中的这些疏水侧链可影响溶菌酶 – 脱乙酰壳多糖复合膜的含水量。

[0073] 表 1 :溶菌酶 – 脱乙酰壳多糖复合膜的组成和物理性能

[0074]

膜类型 ¹	组合物		密度 (g/ml)	含水量 (%)
	溶菌酶 (%, w/w 脱乙酰壳多糖)	甘油 (%, w/w) ²		
L0	0%	25	1.34 ± 0.09	23.6 ± 2.4
L20	20%	25	1.30 ± 0.05	21.7 ± 3.0
L60	60%	25	1.30 ± 0.04	19.0 ± 3.5
L100	100%	25	1.31 ± 0.06	18.8 ± 2.8

[0075] ¹ 膜厚度 = $72.6 \pm 8.2 \mu\text{m}$; L0 = 0% 溶菌酶 (w/w 脱乙酰壳多糖); L20 = 20% 溶菌酶 (w/w 脱乙酰壳多糖); L60 = 60% 溶菌酶 (w/w 脱乙酰壳多糖); L100 = 100% 溶菌酶 (w/w 脱乙酰壳多糖)

[0076] ² 基于 FFS 中脱乙酰壳多糖和溶菌酶的总重量和的甘油重量百分比

[0077] 结果 – 溶菌酶的释放

[0078] 从膜基质释放的溶菌酶的量显示在图 1 中。无溶菌酶 (L0) 的脱乙酰壳多糖膜不显示对冻干溶壁微球菌的任何溶解活性,而这些活性随着掺入膜基质中的溶菌酶浓度的提高而成比例提高。当溶菌酶 – 脱乙酰壳多糖复合膜置于磷酸盐缓冲液中时,膜因水分子扩散进入聚合膜结构中而膨胀,引起掺入的溶菌酶从膜基质释放进入水相环境。溶菌酶随时间从膜基质对数释放。溶菌酶从膜基质的释放与聚合基质中初始溶菌酶浓度线性相关。48

小时后来自每个膜样本的溶菌酶释放量的百分比对 L20、L60 和 L100 膜而言分别为大约 65%、79% 和 76%。24 小时后,来自每个膜样本的溶菌酶释放量百分比对 L20、L60 和 L100 膜而言分别为大约 48%、75% 和 71%。12 小时后,来自每个膜样本的溶菌酶释放量百分比对 L20、L60 和 L100 膜而言分别为大约 43%、60% 和 56%。1 小时后,来自每个膜样本的溶菌酶释放量百分比对 L20、L60 和 L100 膜而言分别为大约 14%、26% 和 25%。

[0079] 在半-湿食物中,微生物生长主要发生在食物表面上。因此,通过控制和延缓扩散维持食物表面上所需要水平的抗微生物剂对延长食物的贮存期限有利。这些结果表明掺入脱乙酰壳多糖膜的溶菌酶可以控制的方式从膜基质释放并保持对细菌细胞壁基质的溶解活性。例如,约 24 小时后高达约 30% 的溶菌酶未从膜释放。约 48 小时后,高达约 20% 的溶菌酶未从膜释放。

[0080] 结果-抗微生物活性

[0081] 图 2A 和 2B 显示了大肠杆菌和粪链球菌在用溶菌酶-脱乙酰壳多糖膜处理的肉汤培养基中的存活。除了用 L100 膜,溶菌酶-脱乙酰壳多糖复合膜对大肠杆菌的抗微生物效力随着溶菌酶浓度的提高而提高。温育 24 小时后,在具有 L0、L20 或 L60 膜的 BHI 肉汤培养液中细胞数量分别降低约 1.8、2.3 和 2.7log(循环)。同时, L100 膜和对照使细胞数量分别提高约 0.1 和 2.3log(循环)。在回收细胞群后, L100 膜抑制生长高达 6 小时。

[0082] 粪链球菌的生长没有受到含有低浓度溶菌酶的溶菌酶-脱乙酰壳多糖复合膜(L0 和 L20 膜)的有效抑制。对于 L0 和 L20 膜而言,粪链球菌群在暴露 24 小时期间稍有提高。相比之下,在含有 L60 和 L100 膜的肉汤培养基中分别观察到粪链球菌对数(log)水平减少 3.3 和 3.8。对照样品中 24 小时后出现约 1.1 对数(log)(循环)的提高。随着溶菌酶浓度的提高,对革兰氏阳性粪链球菌的抗微生物活性的提高可以表明溶菌酶主要负责该作用。

[0083] 脱乙酰壳多糖对大肠杆菌的抗微生物活性已由 Shahidi(1999)综述。纯脱乙酰壳多糖膜(L0)呈现对革兰氏阴性大肠杆菌的杀菌作用,但对革兰氏阳性粪链球菌的生长几乎没有抑制作用。在 L60 膜中观察到对两种细菌最稳定的抑制倾向。用 L100 膜回收大肠杆菌群值得怀疑,并且可由溶菌酶-脱乙酰壳多糖相互作用的增强进行解释。从膜基质释放的脱乙酰壳多糖分子可堆积在细胞表面或与溶菌酶相互作用而形成溶菌酶-脱乙酰壳多糖复合物。当过量溶菌酶暴露于细胞悬液时,可提高溶菌酶-脱乙酰壳多糖相互作用的可能性。这些相互作用的提高可干扰脱乙酰壳多糖和细胞表面间的反应。

[0084] 在含有最高溶菌酶浓度(L100)的脱乙酰壳多糖膜中呈现出对粪链球菌最强的抗微生物活性,而对于大肠杆菌是在具有 60% 溶菌酶浓度(w/w 脱乙酰壳多糖)的膜中。这些结果表明脱乙酰壳多糖的抗微生物活性可通过将溶菌酶掺入脱乙酰壳多糖膜基质中而得以提高。此外,溶菌酶与脱乙酰壳多糖分子的比率为影响溶菌酶-脱乙酰壳多糖复合膜抗微生物性能的重要因素。

[0085] 结果-水蒸气渗透率

[0086] 膜的水蒸气渗透率(WVP)在测试的浓度水平没有受溶菌酶掺入的显著影响($p < 0.05$)(参见下表 2)。虽然不受任何理论的束缚,该结果可通过两个对立因素的作用而解释。脱乙酰壳多糖膜,如许多其他的蛋白质或多糖可食用膜一样,由于其亲水性而呈现相对低的防水特性。脱乙酰壳多糖膜的防水性能可通过添加疏水材料如脂肪酸而得以改善。由于溶菌酶包含疏水氨基酸侧链,溶菌酶-脱乙酰壳多糖复合膜的亲水性可随着溶菌酶的添

加而降低。然而,脱乙酰壳多糖的致密结构,尤其其结晶部分可由溶菌酶分子破坏,引起通过膜基质的 WVP 的提高。这两个对立因素可随着溶菌酶浓度的改变而抵消或把溶菌酶-脱乙酰壳多糖复合膜的 WVP 特性的改变降到最低。

[0087] 表 2:溶菌酶-脱乙酰壳多糖复合膜的水蒸气渗透率

[0088]

膜类型 ¹	厚度 (μm)	WVP(g mm/m ² d kPa)
L0	72.5±13.4	177.2±47.4
L20	68.8±6.6	157.4±26.5
L60	70.9±4.4	160.0±23.9
L100	69.0±9.8	166.2±22.2

[0089] ¹L0 = 0%溶菌酶 (w/w 脱乙酰壳多糖); L20 = 20%溶菌酶 (w/w 脱乙酰壳多糖); L60 = 60%溶菌酶 (w/w 脱乙酰壳多糖); L100 = 100%溶菌酶 (w/w 脱乙酰壳多糖)

[0090] 结果-机械性能

[0091] 膜的张力强度 (TS) 和断裂时的伸长率 (EL) 随着溶菌酶的添加而显著降低 ($p > 0.05$) (参见下表 3)。TS 和 EL 随着溶菌酶浓度提高的降低可描述为由下列线性方程组:

[0092] $TS = -0.10C_1 + 16.70, R^2 = 0.96$

[0093] $EL = -0.32C_1 + 59.89, R^2 = 0.99$

[0094] 其中 C_1 为溶菌酶-脱乙酰壳多糖膜基质中溶菌酶的百分比浓度 (% , w/w 脱乙酰壳多糖)。此外,发现 EL 和 TS 间存在线性关系:

[0095] $EL = 3.07TS + 8.30, R^2 = 0.98$ 。

[0096] 在 1 : 1 脱乙酰壳多糖和溶菌酶的比率 (L100) 时,TS 和 EL 值分别有 43% 和 48% 的降低。然而,所述降低对于防止使用膜食物保护剂的应用并不十分显著。

[0097] 脱乙酰壳多糖为具有刚性主链结构的优良的成膜线型聚合物,而溶菌酶为具有较低成膜能力的带正电荷的酶。TS 和 EL 的降低表明溶菌酶的掺入削弱了膜的结构和完整性。溶菌酶分子引入脱乙酰壳多糖膜基质中可能破坏晶体结构的形成并且削弱脱乙酰壳多糖分子间的分子间氢键。膜基质中脱乙酰壳多糖和溶菌酶分子间增强的相互作用可能是溶菌酶-脱乙酰壳多糖复合膜中 TS 和 EL 变化的原因。降低的 TS 和 EL 值还归因于溶菌酶对脱乙酰壳多糖分子的降解,所述溶菌酶为几丁质分解酶。由溶菌酶降解脱乙酰壳多糖分子可通过利用高度去乙酰化的脱乙酰壳多糖 (例如至少约 95% 的脱乙酰程度) 而减少。此外,溶菌酶-脱乙酰壳多糖复合膜的机械性能和防水性能可通过利用膜基质中的交联剂,如戊二醛而得以改善。

[0098] 表 3:溶菌酶-脱乙酰壳多糖复合 1 的机械性能

[0099]

膜类型 ¹	厚度 (μm)	张力强度 (Mpa)	伸长率 (%)
L0	74.9±15.5	17.4±4.6	60.3±16.2

L20	70.8±9.2	14.4±3.4	53.8±9.0
L60	73.0±8.9	9.5±2.3	39.3±11.7
L100	69.9±9.2	7.4±1.5	29.1±8.2

[0100] $L0 = 0\%$ 溶菌酶 (w/w 脱乙酰壳多糖); $L20 = 20\%$ 溶菌酶 (w/w 脱乙酰壳多糖); $L60 = 60\%$ 溶菌酶 (w/w 脱乙酰壳多糖); $L100 = 100\%$ 溶菌酶 (w/w 脱乙酰壳多糖)。

[0101] 结果 - 微观结构

[0102] 脱乙酰壳多糖和溶菌酶间优良的生物相容性以及溶菌酶在整个脱乙酰壳多糖基质中的均匀分布通过 SEM 显微照片得以证实。图 3A-3D 显示了 1000X 放大倍数下成膜期间暴露于空气的溶菌酶-脱乙酰壳多糖复合膜的外表面。如 SEM 显微照片所示, 膜的表面结构致密并且均匀。所有膜具有显示连续结构而在基质中无任何孔或裂缝的均匀外观。L60 (3C) 和 L100 (3D) 膜的显微照片显示膜表面上明亮的大理石状纹。这种大理石状纹为均匀分布的并且随着溶菌酶浓度的提高而增加。白色区域代表脱乙酰壳多糖基质中溶菌酶微-颗粒的沉积。

[0103] 图 4A-4D 显示溶菌酶-脱乙酰壳多糖复合膜中横截面的显微照片。通过用液氮冷冻膜并随后将它们断裂而获得锋利的边缘。如图 4A-4D 所示, 脱乙酰壳多糖和溶菌酶间没有垂直裂缝或相分离。除了一些平行于表面的断裂外截面结构为致密并连续的, 可能在膜断裂时已经形成。溶菌酶在整个膜基质中的均匀分布通过具有高溶菌酶浓度的膜的均匀外观显示 (4C 和 4D)。L20 膜的显微照片 (4B) 显示杂质可能在干燥期间落于膜上。这类污染可能是溶剂蒸发成膜方法的缺点, 尤其是如果膜在露天环境中浇铸和干燥的话。

[0104] 预实施例 2

[0105] 选择性的 FFS 可通过在 65°C 将 2wt% 脱乙酰壳多糖溶解于添加了 50wt% 十二烷酸, 25wt% 甘油和 100wt% 溶菌酶 (w/w 脱乙酰壳多糖) 的 1wt% 乙酸溶液中而进行制备。然后如实施例 1 所述制备膜。向成膜溶液中添加脂肪酸 (即, 十二烷酸) 可改善膜的防水性能, 并且不明显影响其抗微生物活性。

[0106] 实施例 3

[0107] 通过将脱乙酰壳多糖溶液与溶菌酶溶液混合而制备涂布溶液。通过将 3% 脱乙酰壳多糖溶解于添加了 25% 甘油 (w/w 脱乙酰壳多糖) 的 1% 乙酸溶液中而制备脱乙酰壳多糖溶液。通过将 10% 的溶菌酶溶解于添加 25% 甘油 (w/w 溶菌酶) 的蒸馏水中制备溶菌酶溶液。溶菌酶溶液混合到脱乙酰壳多糖溶液中至 60% 的浓度 (每干重脱乙酰壳多糖的溶菌酶的干重百分比)。产生的混合物利用均质器 (PT10-35, Kinematica, Switzerland) 在 3,000rpm 匀化 60 秒。单核细胞增多性李氏菌 ATCC 15313 和植物乳杆菌用作测试微生物来评估食物表面上涂布处理的抗微生物效力。单核细胞增多性李氏菌和植物乳杆菌分别在脑心浸液培养液 (BHI) 和 MRS 肉汤培养基中 37°C 过夜培养。

[0108] 获得商业生产的牛柳 (beef franks) (Bun-Length, Oscar Mayer Foods Corp., Madison, WI) 并且在无菌条件下切成 26mm 长度 (~10g)。将牛柳片浸入涂布溶液 30 秒并且在垂直层状气流工作台 (100-plus, Enviroco Corp., Albuquerque, New Mexico) 中干燥 30 分钟。未-涂布的对照和涂布的样品用 100 μ l 单核细胞增多性李氏菌或植物乳杆菌 (~

2×10³CFU/ml) 接种,置于200mm×150mm真空塑料袋中 (FoodSaver Rolls,Tilia,Inc. ,San Francisco, CA),并用热封机 (FoodSaver Vac 1075,Tilia,Inc. , SanFrancisco, CA) 真空包装。

[0109] 在 22.5±1℃贮藏 4 天后,将每一牛柳样品置于无菌兜包袋中。真空塑料袋用 90ml 的 0.1%的蛋白胨水漂洗并且转入同样的兜包袋中。样品用兜包型粉碎机 (Stomacher 400Circulator, Seward, London, UK) 在 230RPM macerate 2 分钟。一式两份对悬浮液的微生物群计数。BHI 和 MRS 琼脂分别用于单核细胞增多性李氏菌和植物乳杆菌。含有微生物介质的塑料平皿在微生物菌落计数前在 37℃温育 48 小时。

[0110] 涂布处理对接种于涂布的和未 - 涂布的牛柳表面上单核细胞增多性李氏菌或植物乳杆菌生长的影响显示在表 4 中。溶菌酶 - 脱乙酰壳多糖复合涂布处理导致牛柳表面上单核细胞增多性李氏菌的生长抑制。然而同样的条件下观察到植物乳杆菌细胞数量的少量提高。

[0111] 表 4 :涂布对用单核细胞增多性李氏菌或植物乳杆菌接种的牛柳的微生物生长的影响

[0112]

微生物	处理	Log CFU/g 牛柳	
		0 天	4 天
单核细胞增多性李氏菌	未涂布的	2.39	3.74
	涂布的	2.39	0
植物乳杆菌	未涂布的	3.15	4.27
	涂布的	3.15	4.24

[0113] 实施例 4

[0114] 商业生产的培养基切达干酪 (cheddar cheese) (Tillamook County Creamery Association,Tillamook,OR) 用作用于证实溶菌酶 - 脱乙酰壳多糖复合物涂布应用的抗微生物性能的另一种食物系统。干酪块无菌切至 60mm×26mm×5mm 大小 (~ 10g),并用实施例 3 中所述的涂布溶液涂布。所有方法与实施例 3 的相同。如表 5 所示,干酪切片表面上的单核细胞增多性李氏菌和植物乳杆菌的生长均受到抑制。

[0115] 表 5. 涂布对用单核细胞增多性李氏菌或植物乳杆菌接种的切达干酪片的微生物生长的影响

[0116]

微生物	处理	Log CFU/g 干酪	
		0 天	4 天

单核细胞增多性李氏菌	未涂布的	4.99	4.35
	涂布的	4.99	4.09
植物乳杆菌	未涂布的	5.06	4.60
	涂布的	5.06	4.06

[0117] 实施例 5

[0118] 根据实施例 1 中所述的方法制备溶菌酶脱乙酰壳多糖溶液,除了用 2% 的脱乙酰壳多糖代替 3% 的脱乙酰壳多糖。成膜溶液在具有 260mm×260mm 面积的水平 Teflon- 涂布的玻璃板上浇铸并在环境条件下干燥 ($22.5 \pm 1^\circ\text{C}$ 和 $40 \pm 5\%$ 相对湿度 {RH}) 2 天。从板上取下干膜并且切成 65×30mm 大小的切片。产生的膜的厚度为 $85 \pm 9 \mu\text{m}$ 。膜切片保存在设置为 25°C 以及 50% RH 的环境室中 (TIORS, Tenney Environmental, Williamsport, PA) 2 天。

[0119] 切达干酪 (Tillamook County Creamery Association, Tillamook, OR) 无菌切成 60mm×26mm×5mm 的矩形大小并用 100 μl 单核细胞增多性李氏菌或植物乳杆菌 ($\sim 2 \times 10^3 \text{CFU/ml}$) 接种。接种的每片干酪夹在两个同等处理的膜切片间。获得商业生产的牛柳 (Bun-Length, Oscar Mayer Foods corp., Madison, WI) 并在无菌条件下切成 26mm 长 ($\sim 10\text{g}$) 且真空包装于 200mm×150mm 的真空塑料袋中 (FoodSaver Rolls, Tilia, Inc., San Francisco, CA)。贮存条件和微生物计数与实施例 3 所述方法相同。

[0120] 如表 6 所示,溶菌酶-脱乙酰壳多糖复合膜降低了干酪表面上微生物的生长。植物乳杆菌比单核细胞增多性李氏菌对膜更敏感。与干酪表面处理的例子相比,膜处理呈现比涂布处理更强的抗微生物活性。

[0121] 表 6. 膜施用对用单核细胞增多性李氏菌或植物乳杆菌接种的切达干酪片的微生物生长的影响

[0122]

微生物	处理	Log CFU/g 干酪	
		0 天	4 天
单核细胞增多性李氏菌	未涂布的	4.99	4.35
	涂布的	4.99	3.60
植物乳杆菌	未涂布的	5.06	4.60
	涂布的	5.06	1.39

[0123] 根据一些实施例举例说明和描述了本发明所公开的方法、膜和食品的原理,很显然,这些方法、膜和食品可在不背离所述原理的条件下进行详细的改进。

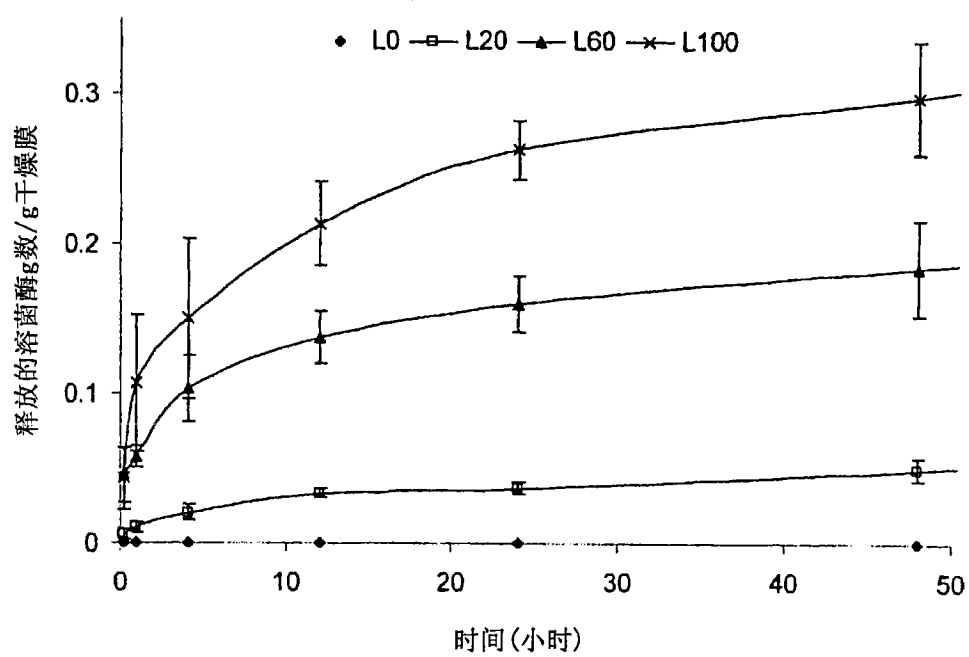


图1

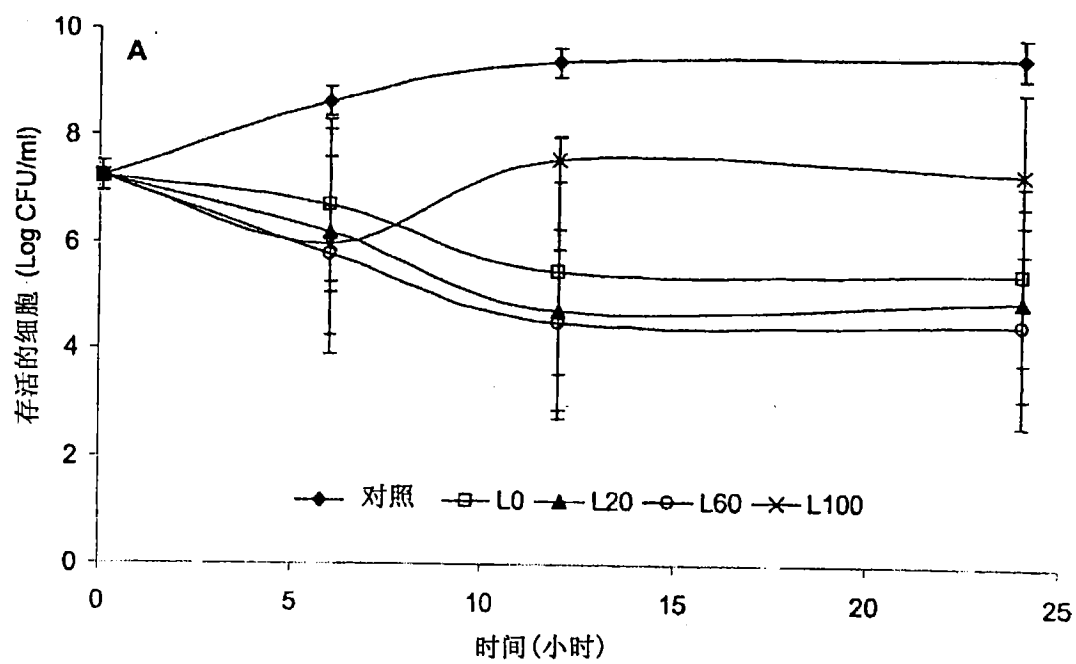


图2A

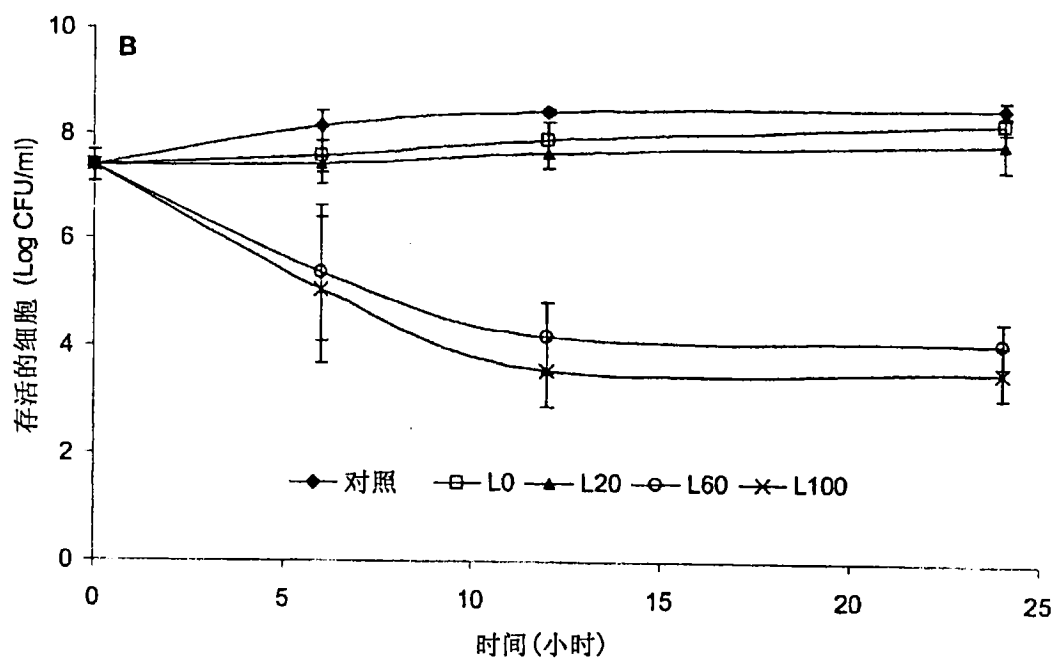


图2B

图3A

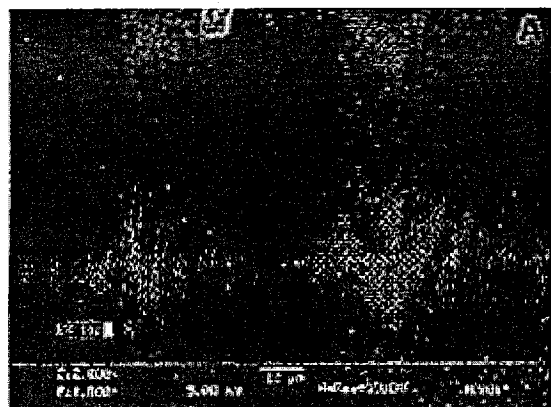


图3B

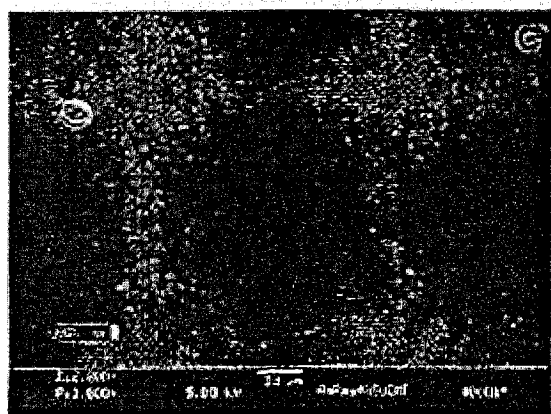
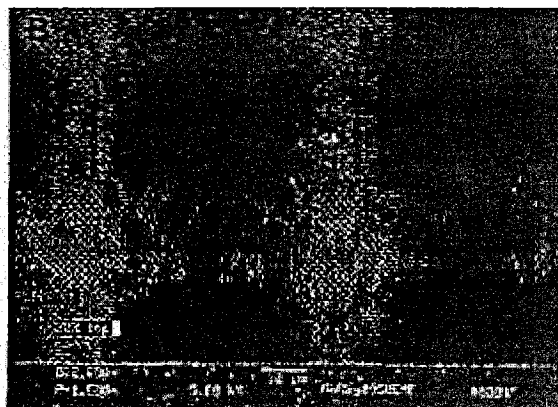


图3C

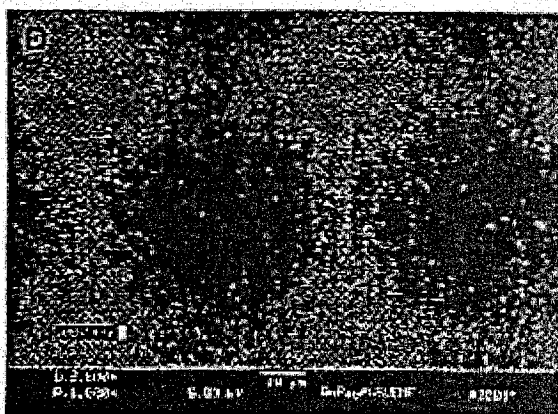


图3D

图4A

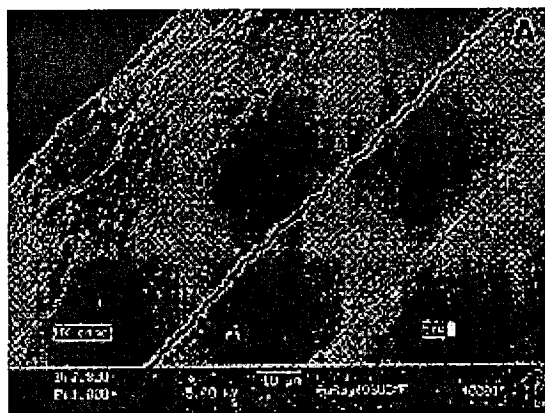


图4B

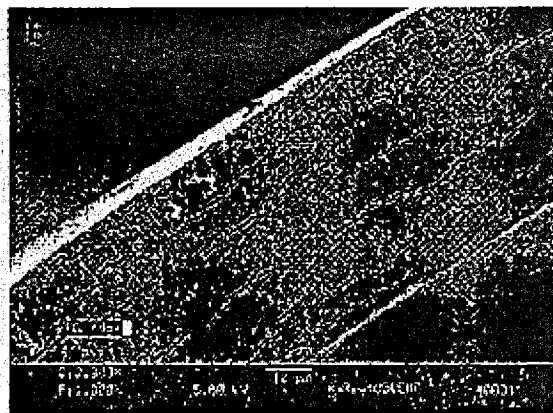


图4C

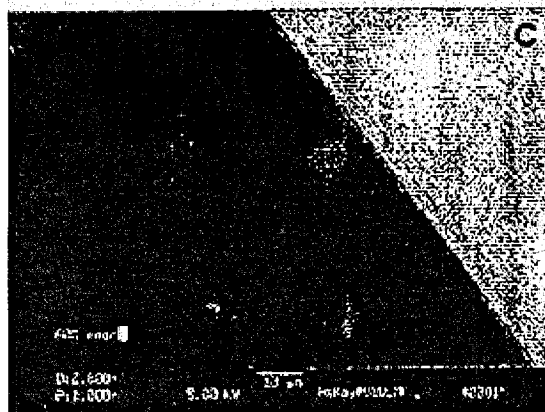


图4D

